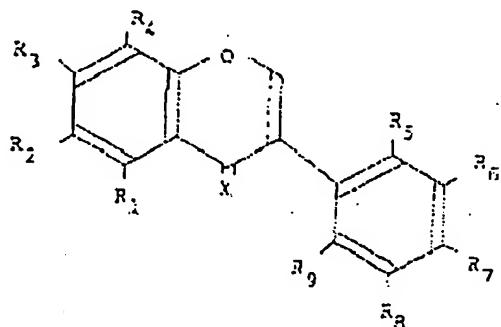


Japanese laid-open application H02-124883, (published on 05/14/1990, assignee Kitasato Institute, titled "Isoflavone derivatives which have anti-oxidation activity and manufacturing methods") discloses isoflavone compounds that have a general formula shown below.

Claim 1 translation:

[Isoflavone compounds or salts of such isoflavone compounds that have a general formula:



wherein ----- is double bond or single bond, X is O or H₂, R1 – R9 are H, OH, OCH₃, OC₂H₅, SCH₃, COO, or halogen, either one of both of R1 and R1, R2 and R3, R3 and R4, R5 and R4, R6 and R7, R4 and R8, R8 and R9 can be methylenedioxy group.]

Claim 2 relates to a manufacturing method using microorganism. The purpose of this research is to produce compounds that have antioxidation activity. There are data showing the antioxidation activity of these compounds.

⑩ 日本国特許庁 (JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

平2-124883

⑬ Int. Cl.

C 07 D 311/58
311/04
311/36
311/38
311/64
C 09 K 15/10
C 12 P 17/18
//C 12 P 17/18
C 12 R 1:465

識別記号

序内整理番号

⑭ 公開 平成2年(1990)5月14日

D 7375-4C
7375-4C
7375-4C
7375-4C
7375-4C
7043-4H
8931-4B

審査請求 未請求 請求項の数 2 (全11頁)

⑮ 発明の名称 抗酸化作用を有するイソフラボン誘導体およびその製造法

⑯ 特願 昭63-278780

⑰ 出願 昭63(1988)11月4日

⑱ 発明者 大村 智 東京都世田谷区瀬田5-12-7

⑲ 発明者 小見山 寛樹 神奈川県横浜市南区六ツ川2丁目3番地の301 サンライズ弘明寺104号

⑳ 発明者 船山 信次 神奈川県横浜市緑区長津田7丁目10-18-301

㉑ 出願人 北里研究所(社団法人) 東京都港区白金5丁目9番1号

㉒ 代理人 弁理士 小林 和意 外1名

明細書

1. 発明の名称

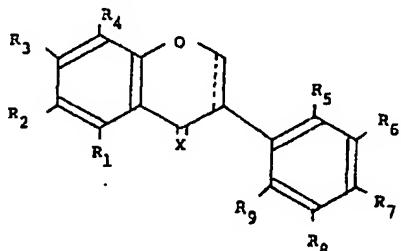
抗酸化作用を有するイソフラボン誘導体およびその製造法

は2つ以上のメチレンジオキシ基を形成していてよい)で表されるイソフラボン誘導体またはその塩。

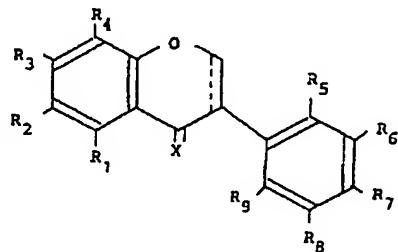
(2)、ストレプトマイセス属に属し、一般式

2. 特許請求の範囲

① 一般式



(式中、—は一重結合または二重結合、XはOまたはH₂、R₁～R₉は各々H、OH、メトキシ、エトキシ、メチルチオ、カルボン酸またはハロゲン原子を示すか、あるいはR₁とR₂、R₂とR₃、R₃とR₄、R₄とR₅、R₅とR₆、R₆とR₇およびR₇とR₈のいずれか1つまたは2つ以上のメチレンジオキシ基を形成してもよい)で表されるイソフラボン誘導体を生成する能



(式中、—は一重結合または二重結合、XはOまたはH₂、R₁～R₉は各々H、OH、メトキシ、エトキシ、メチルチオ、カルボン酸またはハロゲン原子を示すか、あるいはR₁とR₂、R₂とR₃、R₃とR₄、R₄とR₅、R₅とR₆、R₆とR₇およびR₇とR₈のいずれか1つまたは2つ以上のメチレンジオキシ基を形成してもよい)で表されるイソフラボン誘導体を生成する能

力を有する微生物を培地に培養してはイソフラボン誘導体を生産蓄積せしめ、得られた培養物から該イソフラボン誘導体を採取することを特徴とする上記一般式で表されるイソフラボン誘導体またはその塩の製造法。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、抗酸化剤として有用なイソフラボン誘導体およびその製造法に関する。

(従来の技術)

従来、天然物由來の抗酸化活性を有する物質としては、 α -トコトリエノール、 γ -トコフェロール、ビタミンE、イソフラボン誘導体などが知られている。.

イソフラボン誘導体は、植物由來または化学合成により得られることが知られている〔An. Acad. Brasili. Cienc. 40, 147-150 (1968)、Agr. Biol. Chem., 32 (6), 740~746 (1968)、J. Agr. Food. Chem.,

24, 1174~1177 (1976)、米国特許第4,157,984 (1979)、米国特許第4,264,509 (1981)〕が挙げられる。

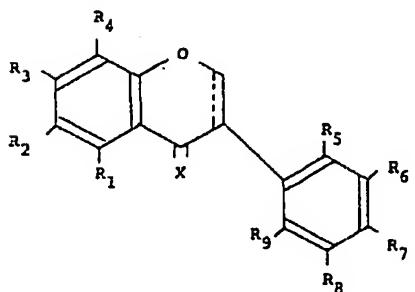
(発明が解決しようとする課題)

本発明は、微生物の生産する抗酸化活性物質を得ることを目的とする。

(課題を解決するための手段)

本発明者らは、有用な生理活性物質を得ることを目的として、種々の放線菌を分離し、その生産物について研究を行った結果、東京都墨田区の土壤から新たに分離した放線菌が、その培養物中に抗酸化活性を有するイソフラノイド誘導体を生産することを見出し、本発明を完成したものである。

即ち、本発明は、一般式



(式中、—は一重結合または二重結合、XはOまたはH₂、R₁～R₆は各々H、OH、メトキシ、メチルチオ、エトキシ、カルボン酸またはハロゲン原子を示すか、あるいはR₁とR₂、R₃とR₄、R₅とR₆、R₆とR₇、R₇とR₈およびR₈とR₉のいずれか1つまたは2つ以上のメチレンジオキシン基を形成してもよい)で表されるイソフラボン誘導体またはその塩およびその製造法である。

上記の塩としては、薬学的に許容し得る塩が好ましい。例えば、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩などが挙げられる。

本発明のイソフラボン誘導体を生産する能力を有する微生物は、ストレプトマイセス属に属するが、例えば本発明者らが分離したストレプトマイセス属に属する菌株OH-1049は、本発明に最も効果的に使用される菌株の一例であって、本菌株OH-1049の菌学的性質を示すと次の通りである。

(1) 形態的性質

栄養菌糸は、各種寒天培地上でよく発達し、分断は観察されない。気菌糸はスター形無糖寒天培地等で豊富に着生し、灰色を呈する。顕微鏡下の観察では、気菌糸は直線状を呈し、20ヶ以上の胞子の連鎖が認められる。胞子の大きさは1.1×0.7μmで、卵型である。胞子の表面は平滑である。菌核、胞子のうおよび遊走子は見出されない。

(II) 各種培地上での性状

イー・ピー・シャーリング(E. B. Shiring)とデー・ゴットリープ(D. Gottlieb)の方法(インターナショナル・ジャー

ナル・オブ・システィマティック・バクテリオロジー、16巻、313頁、1966年)によって調べた本生産菌の培養性状を次表に示す。色調は標準色として、カラー・ハーモニー・マニュアル第4版(コンテナー・コーポレーション・オブ・アメリカ・シカゴ、1958年)を用いて決定し、色票名とともに括弧内にそのコードを併せて記した。以下は特記しない限り、27℃、2週間目の各培地における観察の結果である。

培养性状

シュクロー ス・硝酸塗寒 天	生育 裏面	貧弱に生育、無色 ライトアイボリー (2c a)
	気菌糸	貧弱、粉状、 ライトベージュ (3e c)
	可溶性色素	生産しない

グルコース・ アスパラギン 寒天 (ISP)	生育 裏面	良好に生育、 ライトアイボリー (2c a)
	気菌糸	豊富に着生、 ピロード状、 シルバーグレイ (3f e)

グリセロール ・アスパラギ ン寒天 (ISP)	生育 裏面	良好に生育、 ライトアイボリー (2c a)
	気菌糸	豊富に着生、 ピロード状、

スクーチ・無 機塩寒天 (ISP)	可溶性色 素	アミューズ (5f e) 生産しない
	生育 裏面	良好に生育、 ライトホワイト (2e a)
	気菌糸	ライトマスター タン(2i e) 豊富に着生、 ピロード状、 アミューズ (5f e)

チロシン寒天 (ISP)	可溶性色 素	生産しない
	生育	良好に生育、 アイボリ (2d b)

オートミル寒 天 (ISP)	裏面	クラブブラウン (3p e)
	気菌糸	中程度に着生、 ピロード状、 コバルトグレイ (2f e)

オートミル寒 天 (ISP)	生育	中程度に浸透して 生育、
	裏面	ライトアイボリー (2c a)

オートミル寒 天 (ISP)	裏面	ライトマスター タン(2i e)
	気菌糸	中程度に養成、 ピロード状、 シャドーグレイ (5i h)

	可溶性色素	生産しない
酵母エキス・ 玄芽エキス寒天 (ISP)	生育	中程度に生育、 ライトアイボリー (2c a)
	裏面	ライトマスター タン (21 e)
	気菌糸	中程度に着生、 ピロード状、 アミューズ (5f e)
	可溶性色素	生産しない

	氣菌糸	豊富に着生、 ピロード状、 ブッシウイロー グレイ (5d c)
ペプトン・酵母エキス寒天 (ISP)	可溶性色素	生産しない
	生育	良好に生育、 ローズベージュ (4g c)
	裏面	ライトアンバー (3i c)
	気菌糸	中程度に着生、 ピロード状、 クリーム ()
	可溶性色素	メイプル (4g e)

	生育	貧弱に生育、 無色
グルコース・ 硝酸塩寒天	裏面	パール (3b a)
	気菌糸	貧弱に着生、 サンド (3c b)
	可溶性色素	生産しない
	生育	良好に生育、 ライトアイボリー (2c a)
グリセロール・ リンゴ酸カルシウム寒天	裏面	サンド (3c b)
	気菌糸	中程度に着生、 ピロード状、 アミューズ (5f e)
	可溶性色素	生産しない

	生育	良好に生育、 ライトアイボリー (2c a)
グルコース・ ペプトン寒天	裏面	ライトホワイト (2e a)
	気菌糸	中程度に着生、 ピロード状、 ホワイト (a)
	可溶性色素	あるいは パールグレイ (13d c)
	生育	生産しない

(III) 生理学的諸性質

(1) メラニン色素の生成

(イ) チロシン寒天 陰性
(ロ) ペプトン・イースト鉄寒天 陰性
(ハ) グルコース・ペプトン・ゼ

ラチン培地 (21~23℃)	陰性
(ニ) トリプトン・イースト液	陰性
(四) チロシナーゼ反応	陰性
(五) 硝化水素の生産	陰性
(六) 硝酸塩の還元	陰性
(七) ゼラチンの液化 (21~23℃)	
(グルコース・ペプトン・ゼラチン 培地)	弱陽性
(八) スターチの加水分解	陽性
(九) 脱脂乳の凝固 (37℃)	陰性
(十) 脱脂乳のペプトン化 (37℃)	陽性
(十一) 生育温度範囲 (10~37℃)	
⑩ 氮素源の利用性 (ブリーダム・ゴトリープ寒天培地)	
利用する : グルコース、マンノース、キ シロース、フラクトース、ア ラビノース	
やや利用する : シュークロース	
利用しない : ラフィノース、イノシトール 、ラムノース、メリピオース	

、セルロース

陰性

⑩ セルロースの分解

(IV) 細胞壁組成

細胞壁のジアミノビメリン酸はL型である。以上、本菌の生物学的性状を要約すると次の通りである。気泡糸の形態は直線状で、長い孢子梗を形成する。孢子の表面は平滑である。培養状の特徴としては、栄養糸はアイボリー系の色調を呈し、気泡糸は灰色系の色調を呈する。可溶性色素は生産しない。これらの結果から、本菌株はストレプトミセス属に属する菌種であり、アリドハムとトレスナーの分類 (バージズ・マニュアル・オブ・データーミネーティブ・バクテリオロジー、第8版、748~829頁、1974年) によるグレイシリーズに属する菌種であると考えられる。

なお、本菌株はストレプトマイセス エスピーオH-1049 (*Streptomyces* sp. OH-1049) と称することとした (工業技術院微生物工業技術研究所、受託書「微工研菌寄託第9858、FERM P-9858」)。

以上、イソフラボン誘導体生産菌について説明したが、放線菌の一般的性状として菌学上の性質は極めて変異し易く、一定したものではなく、自然的にあるいは通常行われる紫外線照射、X線照射あるいは変異誘導剤などを用いる人工的変異手段により変異することは周知の事実であり、このような人工的変異株は勿論、自然変異株も含め、ストレプトマイセス属に属し、イソフラボン誘導体を生産する能力を有する菌株は、すべて本発明に使用することができる。

本発明においては、先ずストレプトマイセス属に属し、イソフラボン誘導体を生産する能力を有する微生物が適当な培地に培養される。本微生物の培養においては、通常放線菌を培養する方法が一般に用いられる。培地としては、微生物が同化し得る炭素源、消化し得る窒素源、さらには必要に応じ無機塩などを含有させた栄養培地が使用される。同化し得る炭素源としては、グルコース、フラクトース、マルトース、キシロース、マンニト、グリセリン、縫葉、澱粉、デキストリン、

コーン・ステーブ・リカーなどの炭水化物が単独または組み合わせて用いられる。消化し得る窒素源としては、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、乾燥酵母、大豆粉、大豆蛋白分解物、カゼイン、アミノ酸、尿素、N-Z-アミン、コーン・ステーブ・リカー、フィッシュ・ミールなどの有機窒素源、硝酸塩、アンモニウム塩などの無機窒素化合物が単独または組み合わせて用いられる。その他、必要に応じナトリウム塩、カリウム塐、カルシウム塐、マグネシウム塐、リン酸塩等の無機塩類が添加される。さらに必要に応じ、本菌株の生育やイソフラボン誘導体の生育を促進する重金属、微量栄養源、発育促進物質、前駆物質などを適当に添加してもよい。

培養は通常浸とうまたは通気攪拌培養などの好気的条件下で行うのがよい。工業的には深部通気攪拌培養が好ましい。培養温度は20~40℃でも行い得るが、通常は24~30℃で行うのが好ましい。培養時間は、液体培養の場合、通常1~8日培養を行えばよいが、好ましくはイソフラボ

ン誘導体の培養物中の蓄積量が増大に追した時に培養を終了すればよい。これらの培地組成、培地の液性、培養温度、搅拌速度、通気量などの培養条件は使用する菌株の種類や外部の条件などに応じて好ましい結果が得られるよう適宜調節、選択されることは言うまでもない。液体培養において発泡があるときは、シリコン油、植物油、界面活性剤などの消泡剤を適宜使用される。

このようにして得られた培養物中に蓄積されたイソフラン誘導体は固体内および培養液中に含有されるので、遠心分離して培養液と固体とに分離し、各々からイソフラン誘導体を採取するのが有利である。

培養液からイソフラン誘導体を採取するには、培養液を酢酸エチル等の非親水性有機溶媒で抽出するか、あるいは培養液を活性炭、アルミナ、多孔性合成高分子樹脂、イオン交換樹脂などに吸着させ、酢酸エチルなどの溶出溶媒で溶出し、得られた抽出液または溶出液を減圧濃縮するか、またはヘキサンなどの有機溶媒を加えて沈殿

せられればよい。得られた粗物質は、さらに脂溶性物質の精製に通常用いられる公知の方法、例えばシリカゲル、アルミナなどの担体を用いるカラムクロマトグラフィーにより精製することができる。固体からイソフラン誘導体を採取するには、固体を含水アセトンなどの含水親水性有機溶媒で抽出し、得られた抽出液を減圧濃縮し、その濃縮物を酢酸エチルで抽出し、この酢酸エチル抽出液は、前記の培養液から得た酢酸エチル抽出液と合わせて分離精製するか、あるいは前記と同じ方法で分離精製することができる。

このようにして得られたイソフラン誘導体としては、例えば第1表に記載のOH-1049P物質、OH-1049Q物質、OH-1049R物質が挙げられる。

第1表

化学構造	OH-1049P 物質	OH-1049Q 物質	OH-1049R 物質
X O O O	R ₁ H H OH	R ₂ H H OH	R ₃ OH OH OH

X	O	O	O
R ₁	H	H	OH
R ₂	H	H	H
R ₃	OH	OH	OH
R ₄	OH	H	C ₂
R ₅	H	H	H
R ₆	H	OH	OH
R ₇	OH	OH	OH
R ₈	H	H	H
R ₉	H	H	H
UV	第1図の通り (メタノール中)	第2図の通り (メタノール中)	第3図の通り (メタノール中)
IR	第4図の通り (KBr法)	第5図の通り (KBr法)	第6図の通り (KBr法)

次に実施例を挙げて本発明を具体的に説明する。

【実施例】

実施例1

OH-1049P、Q、R生産菌の培養

500ml容坂口フラスコに食塩0.3%、きな粉2.0%、グリセロール2.0%を含む液体培地(pH7.0)【A培地】100mlを滅菌し、これにグルコース1.0%、ペプトン0.5%、肉エキス0.5%、食塩0.3%、寒天1.2%を含む寒天斜面培地上に27℃で14日間培養したストレプトマイセスエスピーオH-1049の斜面培養から1白金耳を接種し、振幅17cm、毎分120回往復するレシプロカル・シェーカーで、27℃で72時間振とう培養して種母を得た。

次に30L容ジャー・ファーメンターにA培地20Lを仕込み滅菌した後、上記方法で得られた種母1Lを無菌的に移植し、28℃で毎分150Lの空気を通気し、搅拌しながら3日間培養して、培養液約20Lを得た。

実施例2

培養物からのOH-1049P、Q、Rの抽出
 実施例1で得られた培養液に約1kgのハイフロースーパーセルを加え吸引過過し、その培養液約20Lに20%の酢酸エチルを加え攪拌・抽出した。水層と酢酸エチル層とを分液後、水層に再び10%の酢酸エチルを加え、攪拌・抽出した。水層と酢酸エチル層とを分液後、両酢酸エチル層を合わせ、約2Lになるまで減圧濃縮し、濃縮液を約1Lの脱イオン水で洗浄した後、有機溶媒層を無水硫酸ナトリウムで処理して脱水し、溶媒を減圧下で留去した。このようにして、OH-1049P、QおよびR物質を含有する油状物質を得た。

実施例3

シリカゲルクロマトグラフィーによる抗生物質OH-1049P、Q、Rの精製

実施例2で得られた油状物質を、予めクロロホルムを用いて充填された内径7.0mm、長さ300mmのシリカゲル60(Merck社製)カラム

上に吸着せしめ、クロロホルムからメタノールに連続的に変化させる溶出溶媒を用いてクロマトグラフィーを行った。溶出液のうち、抗酸化活性のあるフラクションを集め、減圧濃縮し、純度約10%程度のOH-1049P、Q、R物質含有部分を得た。

実施例4

高速液体クロマトグラフィーによるOH-1049P、Q、R物質の単離

実施例3で得たOH-1049P、Q、R物質含有部分からOH-1049P、Q、Rの純品を得るために次の高速クロマトグラフィーにより分離精製した。

高速液体クロマトグラフィーは、送液ポンプとしてTORI ROTARY-V(日本分光製)、検出器としてUV IDEC-100-V(日本分光製)、カラムは、オクタデシルシラン化シリカゲルのYMC D-O'DS-5、内径2.0mm×長さ250mm(山村化学研究所製)を用いた。実施例3で得たOH-1049P、Q、R粗生成物

約1mgを10μLに溶解させたサンプルを注入し、展開溶出溶媒としてメタノール-水(1:1)混合溶媒を用い、波長270nmの紫外外部吸収でOH-1049P、Q、R物質に該当するピークを集めた。この部分を波圧濃縮して抗OH-1049P、Q、Rの純品をそれぞれ約0.1mgを得た。

実施例5

分取薄層クロマトグラフィーによるOH-1049P、Q、Rの単離

分取薄層クロマトグラフィーは、薄層クロマトグラフィー用プレートとしては、シリカゲル60F254、20×20cm(Merck社製)を用い、実施例3で得たOH-1049P、Q、R粗生成物20mgを少量のクロロホルムに溶かし、これをシリカゲルプレートに帯状にスポットした。この薄層板をクロロホルム-メタノール(9:1)混合溶媒で展開し、UVランプ(254nm)下で検出され得るOH-1049P、Q、Rを含有する帯を選び取られたシリカゲルを、アセ

トンを用いてOH-1049P、Qを抽出することにより、OH-1049P、Q、R物質の純品各々約1.5mgを得た。

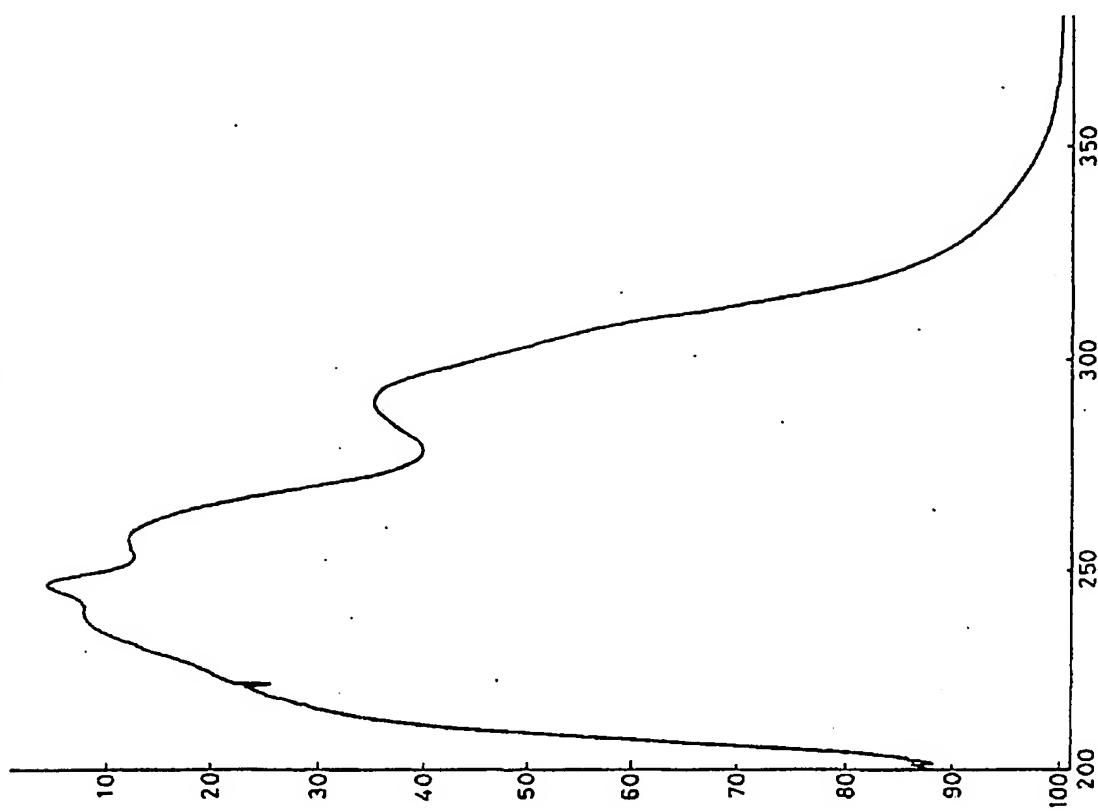
(発明の効果)

本発明のイソフラボン誘導体は抗酸化剤として有用である。活性酵素定量法(Uchiyamaら、Anal. Biochem., 86, 271~278)により、その抗酸化活性を試験した。その結果は第2表の通りである。

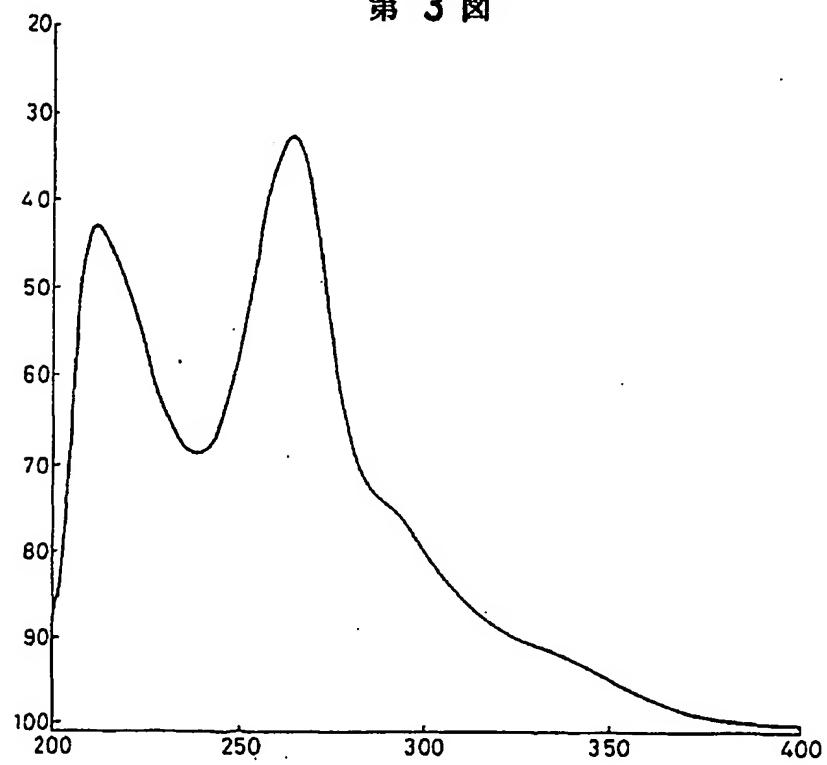
第2表 抗酸化力の比較*

サンプル濃度	100	20	10	4	2	1	0.5
サンプル名	(μg/mℓ)						
α-トコトリ	100	100	-	92	-	42	-
エノール							
γ-トコフェ	100	41	-	4	-	3	-
ロール							
ビタミンE	87	25	-	2	-	0	-
OH-1049P	98	98	-	84	-	42	-

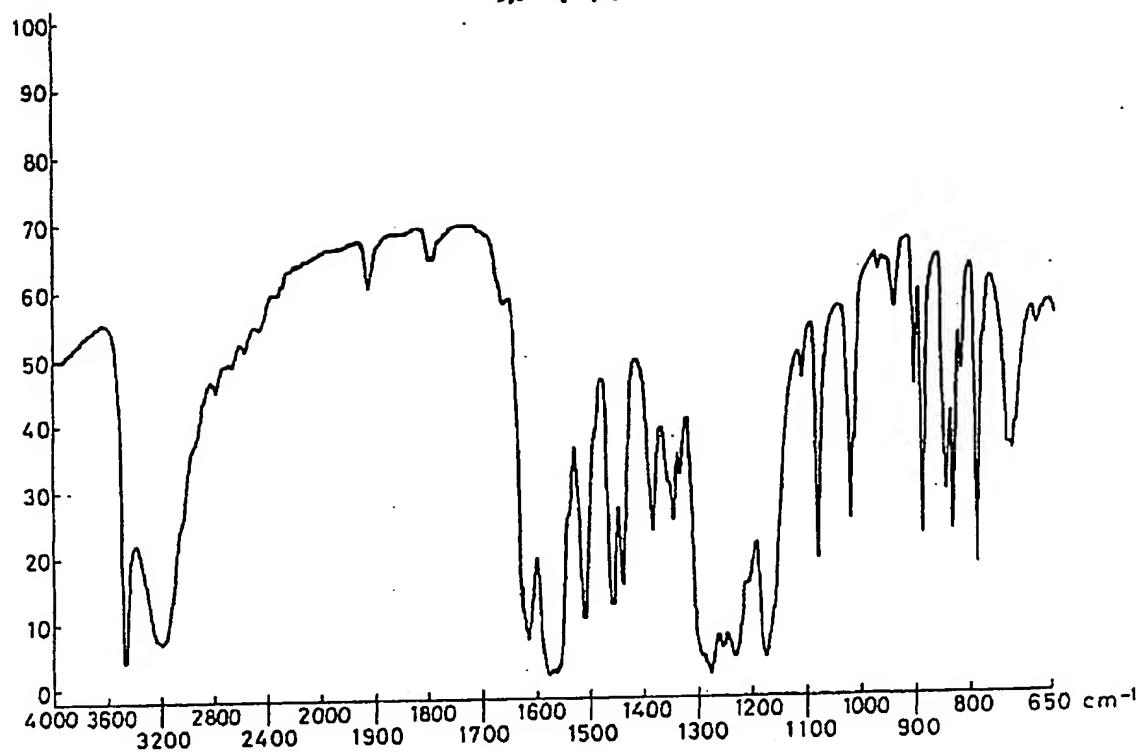
第2図



第3図



第4図



第5図

